



## Producción y evaluación de anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante de la cápside del virus tristeza de los cítricos

MARÍA MAGDALENA IRACHETA CÁRDENAS\*, MARIO ALBERTO ROCHA PEÑA\*\*



El virus de la tristeza (*Citrus tristeza virus*) CTV, con acrónimo en español VTC) es de distribución mundial y ocasiona una de las enfermedades más destructivas en el cultivo de los cítricos.<sup>1</sup> La introducción del CTV en una plantación comúnmente se efectúa mediante el

empleo inadvertido de material de propagación infectado (yemas, plantas de vivero, etc.); la diseminación posterior ocurre por medio de áfidos (principalmente *Aphis gossypii* Glover y *Toxoptera citricida* (Kirkaldy)).<sup>1,2</sup>

Actualmente existen más de 500 mil hectáreas de cítricos en las diferentes zonas agroecológicas de México, las cuales se consideran vulnerables al CTV, por lo que el gobierno federal tiene establecida, desde 1993, la Campaña Nacional Fitosanitaria del

CTV, la cual tiene como objetivo detectar plantas infectadas por el virus y su eliminación de las plantaciones. La conducción de la Campaña del CTV se rige bajo la Norma Oficial Mexicana No. 031,<sup>3</sup> y se lleva a cabo a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) en coordinación con los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de cada estado citrícola. La parte operativa del análisis de muestras se realiza a través de una red de laboratorios acreditados de diagnóstico fitosanitario, presentes en diferentes partes del país. Hasta 2006, el muestreo incluyó más de 60,000 hectáreas distribuidas en todo el territorio nacional, en las que se detectaron 4,468 árboles positivos para el CTV, en un total de más de 1'500,000 muestras analizadas en los 20 estados citrícolas del país.<sup>4</sup> La detección del CTV en material de propagación de cítricos se lleva a cabo rutinariamente mediante la técnica ELISA, para lo cual se utilizan estuches serológicos, de varias compañías comerciales, principalmente de Estados Unidos y España; por esta razón, anualmente se importan grandes cantidades de estuches serológicos comerciales procedentes del extranjero. Los kits comerciales son eficientes para la detección del CTV

□ El presente artículo está basado en la investigación "Evaluación de anticuerpos para la proteína recombinante de la cubierta del virus de la tristeza de los cítricos", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2007 en la categoría de Ciencias de la Tierra y Agropecuarias, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2007.

El presente trabajo fue publicado previamente en la Revista Mexicana de Fitopatología 24:137-144 (2006)

\*Instituto de Biotecnología. FCB-UANL.

\*\*INIFAP/UANL. Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular. Contacto: miracheta@fcb.uanl.mx

en muestras de cítricos,<sup>5</sup> sin embargo, son costosos y su disponibilidad en ocasiones no es inmediata.

En el laboratorio se ha efectuado la caracterización serológica y molecular de varios aislamientos del CTV,<sup>6,7</sup> y se han desarrollado anticuerpos específicos para la proteína del gen p25 de la proteína de la cápside (CP) de varios aislamientos del CTV expresada en *Escherichia coli*.<sup>8</sup> En la presente publicación se reporta la eficiencia de los anticuerpos desarrollados para la proteína recombinante (rCP) del CTV, como anticuerpos primarios (tapizado) y como anticuerpos intermedios en pruebas de ELISA indirecta, utilizando anticuerpos comerciales anti-CTV como referencia.

## Materiales y métodos

### Descripción de los anticuerpos

Los anticuerpos evaluados en el presente estudio (tabla I) se obtuvieron a partir de cultivos de *Escherichia coli* BL21 transformados con el gen p25 CP del CTV.<sup>6</sup> La proteína recombinante (rCP) de los tres aislamientos se fraccionó en geles de poliacrilamida a 12% en condiciones desnaturalizantes, se dializó extensivamente en solución amortiguadora y se empleó para inmunizar animales de laboratorio.<sup>6,8</sup> Las inmunoglobulinas IgG presentes, denominadas de aquí en adelante *anticuerpos rCP*, se precipitaron con sulfato de amonio y se ajustaron a valores de 1 mg/ml (= 1.45 DO<sub>280</sub>).<sup>9</sup>

### Pruebas sexológicas

El estudio se llevó a cabo utilizando la técnica ELISA, en su modalidad de *sandwich* de doble anticuerpo indirecto (DASI).<sup>10</sup> La incubación con las diferentes combinaciones de anticuerpos y antígenos fue como sigue: anticuerpos primarios (tapizado), 6 h a 37°C; antígeno, 16-18 h a 5°C; anticuerpo intermedio, 4 h a 37°C; conjugado enzimático, 2 h a 37°C. Las lecturas de densidad óptica (DO) se registraron en un espectrofotómetro Biotek EL 611. Cuando se empleó conjugado enzimático acoplado a fosfatasa alcalina, las lecturas de DO se efectuaron a 405 nm (DO<sub>405</sub>) a los 60 min después de agregar el sustrato de p-nitrofenil fosfato. Cuando se em-

pleó conjugado a base de peroxidasa, la reacción con el sustrato tetrametilbencidina se detuvo a los 10 minutos con HCl y la densidad óptica se registró a 450 nm (DO<sub>450</sub>).

### Protocolo de evaluación

En la tabla II se describen las combinaciones de anticuerpos evaluados. Los anticuerpos rCP se emplearon a una concentración de 1.0 mg/ml para el tapizado de las placas y como anticuerpos intermedios se evaluaron a concentraciones de 0.2 y 0.1 ml/ml. Como antígeno, se utilizó tejido de cítricos infectado con los aislamientos T36,<sup>11</sup> T55 y T66 del CTV<sup>12</sup> en dilución 1:10 (p/v) en solución amortiguadora de extracción. Como control negativo se utilizó tejido de cítricos sano desarrollado en invernadero. Los conjugados enzimáticos de IgG de cabra anti-IgG de conejo acoplada a fosfatasa alcalina o IgG de cabra anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa, según fuera el caso, se utilizaron a las concentraciones recomendadas por los fabricantes. Se efectuaron cuatro repeticiones por cada muestra analizada con los diferentes aislamientos del CTV y por cada testigo sano. Se consideraron resultados positivos los valores de densidad óptica mayores a tres veces el promedio de los testigos sanos o 0.100, cualquiera que fuera mayor.<sup>13</sup>

### Comparación de anticuerpos rCP con un estuche comercial para la detección del CTV

Se evaluó, a manera de kit comercial, la combinación de anticuerpos rCP de cabra T1 (3.0 µg/ml) como anticuerpo primario y de conejo C3 (0.2 µg/ml) como intermedio, y se utilizó para determinar

Tabla I. Anticuerpos rCP desarrollados contra la proteína p25 recombinante de la cápside del virus tristeza de los cítricos.

Clave anticuerpo	Aislamiento del CTV	Animal de laboratorio
C3	MX08	Conejo
C4	MX08	Conejo
C7	MX14	Conejo
C8	MX14	Conejo
SD	B227	Conejo
T1	MX14	Cabra

Tabla II. Combinaciones de anticuerpos evaluados mediante ELISA-DASI.

Exp. No.	Tapizado	Intermedio	Conjugado
1	Cabra IgG anti-rCP CTV (T1)	IgG anti-p25CTV de conejo (C3, C4, C7, C8, SD)	IgG de cabra anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina
2	Conejo IgG anti-p25CTV (C3, C4, C7, C8, SD)	Cabra IgG anti-p25CTV (T1)	IgG de conejo anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa

su reactividad en una colección de 32 aislamientos del CTV del estado de Nuevo León.<sup>14</sup> El ensayo se efectuó por duplicado y en forma paralela con el kit de detección para el CTV de Agdia (SRA 78900/1000, Elkhart, Indiana, USA). Se llevaron a cabo cuatro repeticiones de cada aislamiento del CTV a evaluar, y como controles para el ensayo se incluyeron: 1) tejido de cítricos crecido en invernadero (testigo sano); 2) muestra de tejido desecado (CTV infectado) incluida en el kit de Agdia; 3) tejido de cítricos infectado con los aislamientos del CTV MX08 y MX14 (testigos positivos); 4) rCP MX14 + tejido sano y rCP B227 + tejido sano (100 mg de rCP por ml de extracto de tejido sano).

## Resultados

### Experimento 1

Para la combinación cabra T1/conejo C3, los valores de DO con el tejido infectado con los aislamientos T36, T55 y T66 fueron de 0.444, 1.099 y 1.513, respectivamente, con la dilución de 0.2 mg/ml del anticuerpo intermedio. El valor del testigo sano fue de 0.058 (figura 1A). Para la combinación cabra T1/conejo C4, los valores de DO con el tejido infectado con los aislamientos T36, T55 y T66 fueron de 0.279, 0.123 y 0.324, respectivamente, con la dilución de 0.2 mg/ml del anticuerpo intermedio. El valor del testigo sano fue de 0.037 (figura 1A). Para la combinación cabra T1/conejo C7, los valores de DO con el tejido infectado con los aislamientos T36, T55 y T66 fueron de 0.542, 0.117 y 1.021, respectivamente, con la dilución de 0.2 mg/ml del

anticuerpo intermedio. El valor del testigo sano fue de 0.011 (figura 1A). Para la combinación cabra T1/conejo C8, los valores de DO con el tejido infectado con los aislamientos T36, T55 y T66 fueron de 0.741, 0.101 y 1.268, respectivamente, con la dilución de 0.2 mg/ml del anticuerpo intermedio. El valor del testigo sano fue de 0.005 (figura 1A). Para la combinación cabra T1/conejo SD, los valores de DO con el tejido infectado con los aislamientos T36, T55 y T66 fueron de 0.370, 0.148 y 0.846, respectivamente, con la dilución de 0.2 mg/ml del anticuerpo intermedio. El valor del testigo sano fue de 0.013 (figura 1A). En términos generales, los valores de DO para los tres aislamientos del CTV, T36, T55 y T66 oscilaron en el rango de 0.200 y 1.500; en forma uniforme de reactividad positiva con los anticuerpos evaluados. Asimismo, los valores de DO de los testigos sanos fueron menores a 0.100 (figura 1A).

### Experimento 2

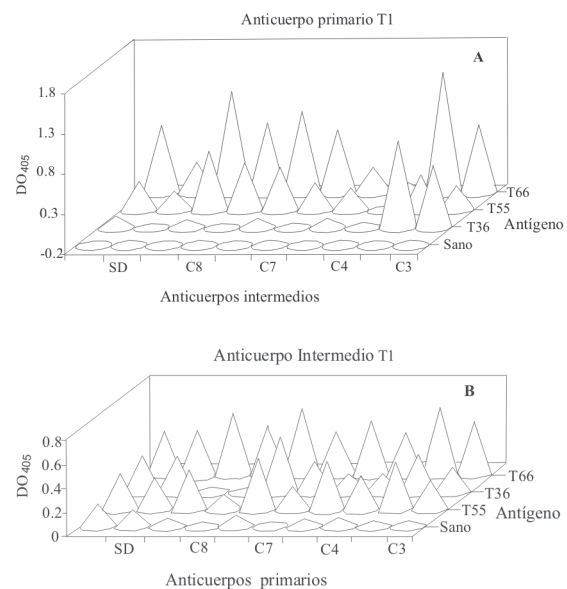


Fig. 1. Comparación de anticuerpos rCP desarrollados para la proteína de la cápside del virus tristeza de los cítricos para la detección del virus en muestras de tejido sano e infectado con los aislamientos T36, T55 y T66. A. Anticuerpos de cabra (T1) como anticuerpos primarios, y anticuerpos de conejo (C3, C4, C7, C8 y SD) como intermedios. B. Anticuerpos de conejo (C3, C4, C7, C8 y SD) como anticuerpos primarios y anticuerpos de cabra (T1) como intermedios.

En términos generales, para las combinaciones de conejo C3, C4, C7 y C8 como tapizados y cabra T1 como intermedio, los valores de DO con el tejido infectado con los aislamientos T36, T55 y T66 fueron en el nivel de 0.300 y 0.600, respectivamente, con la concentración de 0.2 mg/ml del anticuerpo intermedio. Los valores de tejido sano oscilaron entre 0.050 y 0.090 (figura 1B). Para la combinación SD/cabra T1, los valores de DO con el tejido infectado con los aislamientos T36, T55 y T66 fueron de 0.361, 0.349 y 0.425, respectivamente, con la concentración de 0.2 mg/ml del anticuerpo intermedio. El valor del testigo sano fue de 0.210 (figura 1B). En ambos experimentos (1 y 2), los valores de DO para los tres aislamientos del CTV fueron ligeramente menores a los antes descritos, cuando se empleó anticuerpo intermedio a concentración de 0.1 mg/ml (figura 1A y B).

#### **Comparación de anticuerpos rCP con un estuche comercial para la detección del CTV**

En la figura 2 se comparan los valores de DO de la combinación T1/C3 (figura 2A) con el kit de Agdia (figura 2B), empleando la colección de 32 aislamientos del CTV del estado de Nuevo León. Con la muestra correspondiente al testigo sano se obtuvieron valores de DO inferiores a 0.100 para ambos kits de detección. Para el control positivo de Agdia se obtuvieron lecturas de DO de 1.000 y 0.500, para la combinación T1/C3 y kit de Agdia, respectivamente (figura 2A y B). Para los aislamientos MX08 y MX14, se obtuvieron lecturas de DO de 0.700 y 0.680, respectivamente, para la combinación T1/C3, y de 0.300 y 0.320 para la correspondiente del kit Agdia, respectivamente (figura 2A y B). En términos generales, se obtuvieron valores positivos de detección con DO entre 0.180 y 1.580 para la combinación T1/C3 y de 0.300-2.000 para el kit de Agdia (figura 2A y B). Las muestras correspondientes a los aislamientos M L8A2, M L26 A11 y L L3 A16 dieron valores de DO inferiores a 0.100, considerándose como negativos para la combinación T1/C3 y el kit de Agdia. Los valores de DO obtenidos con tejido sano mezclado con las rCPs de MX14 y B227 fueron de 0.390 y 0.320 y de 0.310; de 0.360 para la combinación T1/C3 y para el kit de

Agdia, respectivamente.

#### **Discusión**

Los anticuerpos desarrollados para la rCP mostraron niveles aceptables de detección del CTV cuando fueron empleados en forma combinada (figura 1A y B). No obstante, fue evidente que el sistema tuvo mayores lecturas de DO cuando se empleó como anticuerpo primario el desarrollado en cabra (T1), en combinación con los anticuerpos intermedios desarrollados en conejo para los tres aislamientos del CTV (figura 1A). Lo anterior demostró que los anticuerpos rCP funcionaron bien como tales para atrapar al virus en los ensayos ELISA (figura 1A y B), sobresaliendo la combinación cabra T1/conejo C3 con las mayores lecturas de DO para los tres aislamientos del CTV y menores para el testigo sano (figuras 1A y 2A).

Aunque al comparar los valores de DO de la combinación T1/C3 (figura 2A) fueron ligeramente menores a los obtenidos con el kit de Agdia (figura 2B), cabe señalar que hubo un 100% de coincidencia en ambos kits de detección en todas las muestras que resultaron positivas y negativas para la presencia del CTV; adicionalmente, los valores de DO obtenidos en ambos ensayos serológicos se sometieron a las pruebas Kolmogorov-Smirnov y T-Student, indicando que ambos kits de detección fueron estadísticamente iguales al nivel de significancia del 0.01 (datos no mostrados). Lo anterior pone en evidencia la confiabilidad de la combinación T1/C3 para detectar al CTV en muestras de plantas infectadas con resultados comparables a un kit comercial, como el de Agdia. Las diferencias encontradas con los valores de DO obtenidos con la combinación T1/C3 con el kit de Agdia son similares a las que normalmente se encuentran al comparar diferentes kits comerciales para la detección serológica del CTV.<sup>15</sup> La falla en la detección del CTV en las muestras M L8A2, M L26 A11 y L L3 A16 (figura 2A y B) con ambos sistemas de detección, posiblemente se haya debido a niveles de concentración del CTV en las muestras mencionadas, por debajo de los niveles de detección propios de la técnica ELISA. Los aislamientos del CTV del estado de Nuevo León utilizados para la evaluación de

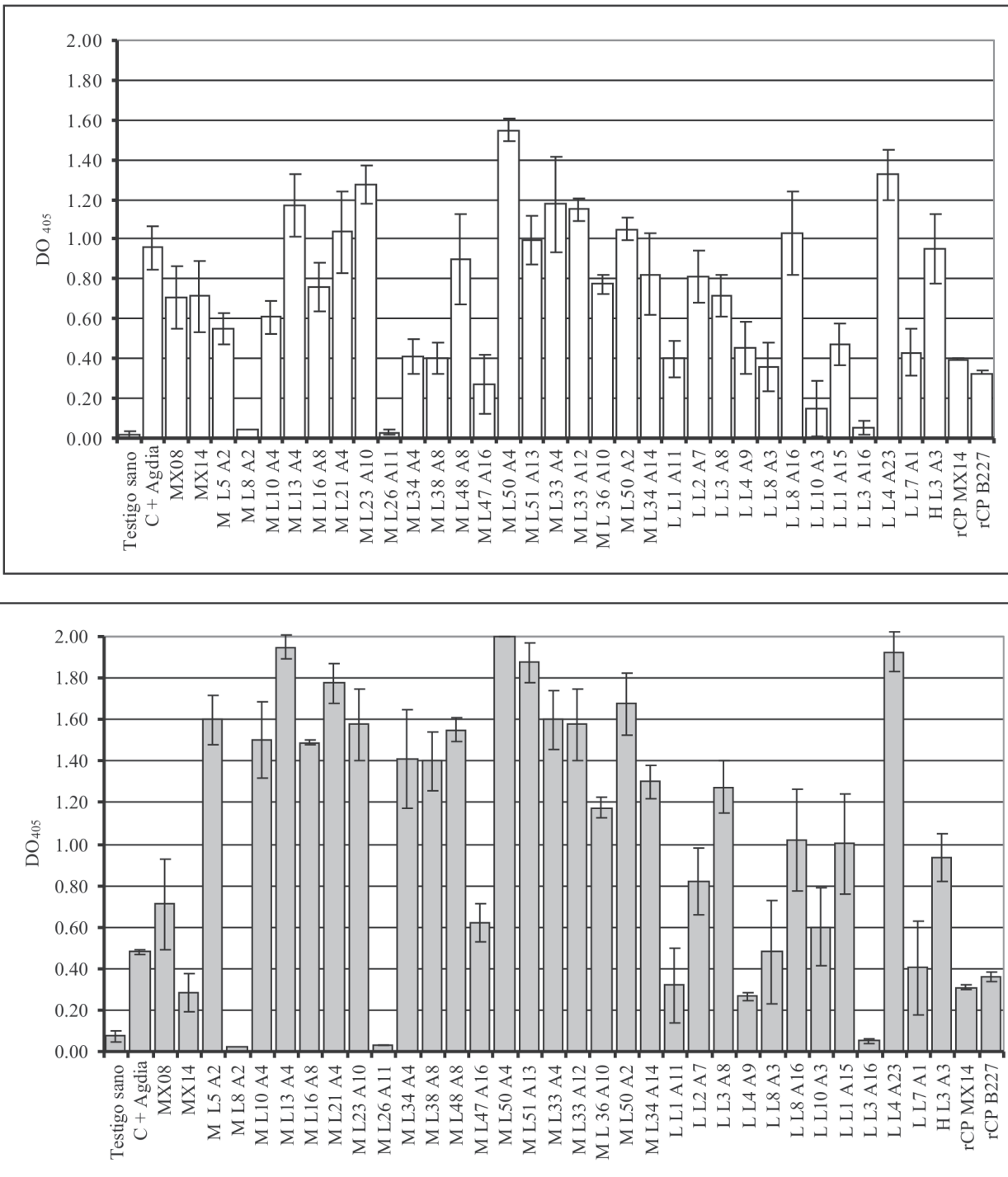


Fig. 2. Comparación de anticuerpos rCP con un estuche comercial para la detección del CTV y evaluación de la proteína recombinante como testigo positivo. A. Combinación T1/C3. B. Kit de Agdia. Ver descripción de tratamientos en materiales y métodos. En la parte superior de cada barra se indica la desviación estándar de los valores de densidad óptica de cuatro repeticiones para cada aislamiento del CTV.



ambos kits de detección se mantienen confinados dentro de estructuras de malla en el invernadero, lo que ocasiona que las plantas normalmente mantengan niveles bajos de concentración viral, cuando se analizan rutinariamente por ELISA. Esta característica los hace adecuados para fines de evaluación de estuches comerciales para la detección del CTV.<sup>5,15</sup>

El empleo de la proteína recombinante ( $DO_{405} = 0.300 - 0.400$ ), para la combinación T1/C3 (figura 2A) y el kit de Agdia (figura 2B) puso en evidencia su utilidad potencial como testigo positivo en ensayos de detección serológica del CTV, sobre todo por su uniformidad de reacción con anticuerpos de naturaleza totalmente diferente, como los contenidos en ambos kits de detección (T1/C3 y Agdia). La ventaja del empleo de la rCP como testigo positivo radica en la facilidad para manipular los cultivos de *E. coli* transformados, que permiten la producción de las cantidades requeridas a una concentración final conocida. Asimismo, por la uniformidad de su reactividad (figura 2A y B), que contrasta con las variaciones en concentración de partículas del CTV en tejido infectado, aun en plantas crecidas en condiciones uniformes en invernadero y, por consecuencia, que impacta en los niveles para su detección del virus.

En el programa de erradicación del CTV en California, USA,<sup>16,17</sup> se emplean en forma rutinaria anticuerpos desarrollados para la rCP del CTV;<sup>18</sup> sin embargo, sólo se utilizan como anticuerpos intermedios para la detección del virus, y atrapan al virus anticuerpos anti-CTV desarrollados en cabra por los métodos convencionales a partir de preparaciones purificadas del virus (M.L. Polek, comunicación personal, 2004). En términos generales, se estima que los resultados obtenidos en el presente estudio (figuras 1 y 2) muestran las bondades del empleo de los anticuerpos desarrollados para la rCP, para discriminar muestras positivas y negativas para la presencia del CTV.

### Perspectivas

A nivel nacional, en los diferentes laboratorios de diagnóstico fitosanitario, acreditados para realizar el análisis masivo de muestras de cítricos se emplea la técnica ELISA para la detección del CTV, me-

dante anticuerpos comerciales específicos anti-CTV, particularmente de España y Estados Unidos. Los estuches comerciales tienen un costo que oscila entre \$2400.00 y 3,000.00 pesos por cada 100 muestras analizadas. Con estos valores, el análisis de las más de 1'500,000 muestras en lo que va de la Campaña del Virus de la Tristeza ha representado un costo estimado arriba de los \$20'000,000.00, sólo por el concepto de kits comerciales importados del extranjero.

Finalmente, los anticuerpos evaluados en el presente estudio, y su potencial comercialización, ofrecen una opción viable junto con los otros kits comerciales disponibles para la detección del CTV. Asimismo, ofrecen una alternativa para una posible reducción de los gastos intrínsecos en la importación de productos del extranjero, así como evitar, en cierta medida, que una campaña nacional, como la relativa a la detección del CTV en México dependa de kits procedentes del extranjero.

### Resumen

En el presente trabajo se desarrollaron anticuerpos específicos contra la proteína recombinante del gen p25 de la cápside (rCP) del virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV), y se evaluaron en pruebas ELISA indirecta con tejido sano e infectado con el CTV. La combinación de anticuerpos rCP desarrollados en cabra para el aislamiento MX14, como anticuerpo primario (tapizado), y los desarrollados en conejo para los aislamientos MX08, MX14 y B227, como anticuerpos intermedios, funcionaron eficientemente con valores de densidad óptica ( $DO_{405}$ ) entre 0.400 y 1.400, para tejido infectado por el CTV, y menores a 0.100, con tejido de plantas sanas. La combinación de anticuerpos rCP T1(cabra anti-CTV MX14) como anticuerpo primario y C3 (conejo anti-CTV MX08) como anticuerpo secundario fue igualmente efectiva como el kit comercial de Agdia, para discriminar muestras positivas y negativas de una colección de 32 aislamientos del CTV de Nuevo León, México. Adicionalmente, las rCP de los aislamientos MX14 y B227, mezcladas con tejido sano, fueron igualmente efectivas que el tejido infectado por el CTV como control positivo en pruebas ELISA, con valores de 0.300

y 0.400 de  $OD_{405}$ . Se discute la aportación de los resultados obtenidos en apoyo a la Campaña Nacional de Detección del Virus Tristeza de los Cítricos en México.

**Palabras clave:** Anticuerpos policlonales, Detección, ELISA, Estuches comerciales.

## Abstract

Polyclonal antibodies specific for the recombinant coat protein (rCP) p25 gene of the Citrus tristeza virus (CTV), were developed and evaluated using healthy and CTV infected tissue. The combination of rCP antibodies developed in goats for isolate MX14 used as primary (coating) antibodies, and rCP antibodies developed in rabbits for isolates MX08, MX14, and B227 as secondary antibodies, reacted efficiently, with optical density ( $OD_{405}$ ) values between 0.400 and 1.400 for CTV infected tissue and less than 0.100 for healthy tissue. The combination of rCP antibodies T1 (goat anti-CTV MX14) as primary antibody and C3 (rabbit anti-CTV MX08) as detection antibody was just as effective as the commercial kit from Agdia for positive and negative sample discrimination from a collection of 32 CTV isolates from Nuevo Leon, Mexico. In addition, the rCP from isolates MX14 and B227 mixed with healthy tissue, were equally effective as positive controls in ELISA tests, with  $OD_{405}$  values in the range of 0.300 and 0.400. The relevance of this work supporting the National Campaign for the Monitoring of CTV in Mexico is discussed.

**Keywords:** Polyclonal antibodies, Detection, ELISA, Commercial kits.

## Agradecimientos

El presente estudio recibió financiamiento de Conacyt/SIREYES Proyecto 032/95; PaicyT-UANL, proyecto CN 463-00 y de la Fundación Produce Nuevo León, A.C., proyecto No. 1322. Monterrey, N.L., México. Los autores agradecen el apoyo técnico de Aurelio Navarro Jáuregui.

## Referencias

1. Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Lastra, R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garnsey, S.M., Yokomi, R.K. 1995a. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79:437-445.
2. Yokomi, R.K., Lastra, R., Stoetzel, M. B., Damgsteet, V. D, Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T. R., Rocha-Peña, M.A., Niblett, C.N. 1994. Establishment of the brown citrus aphid *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera:Aphididae) in Central America and the Caribbean basin and its transmission of citrus tristeza virus. *Journal Economic Entomology* 87:1078-1085.
3. SAGARPA. 2004. Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 15 p.
4. SAGARPA. 2006. Avances del Programa Nacional de Reconversión Productiva de la Cadena Citrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 24 p.
5. Iracheta-Cárdenas, M.M., Peña del Río, M.A. Rocha-Peña, M. A. 2005a. Comparación de antiseros comerciales para la detección del virus tristeza de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:323-328.
6. Iracheta-Cárdenas, M.M., Almeyda-León, I.H., Manjunath, K., Bayram, C., Niblett, C., Lee, R., Rocha-Peña, M.A. 2002. Molecular cloning and expression of the p25 gene of two Mexican isolates of Citrus tristeza virus. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20:174-181.
7. Nava-Coronel, M., Silva-Vara, S., Morales-Loredo, A., Febres, V.J., Niblett, C. L., Lee, R. F., Rocha-Peña, M.A. 1999. Caracterización serológica y molecular de algunos aislamientos del virus tristeza de los cítricos de Nuevo León, México. Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Guadalajara, México. Resumen

- No. 284.
8. Iracheta-Cárdenas, M. M., Rocha-Peña, M.A., Román-Calderón, M.E, Manjunath, K.L. y Lee, R. 2005b. Producción de antisueros para la proteína recombinante de la cápside del virus tristeza de los cítricos. XXXII Congreso Nacional de Fitopatología. Chihuahua, Chihuahua. México. Resumen C-71.
  9. Clark, M.F., Lister, R. M., and Bar-Joseph, M. 1986. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 118:742-767.
  10. Bar-Joseph, M., Malkinson, M. 1980. Hen yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant viruses. *J. Virol. Meth.* 1:1-5.
  11. Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., Roistacher, C.N., Civerolo, E.L., Lee, R.F., Yokomi, R.K. 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19:151-157.
  12. Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Yokomi, R.K. 1995b. Biological properties and aphid transmission of selected citrus tristeza virus isolates from Florida. *Revista Mexicana de Fitopatología* 13:88-94.
  13. Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Niblett, C.L. 1991. Development of a dot-immunobinding assay for citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods* 34:297-309.
  14. Silva-Vara, S., Peña del Río, M.A., Peña-Martínez, R., Villegas-Jiménez, N., Byerly-Murphy, K.F. Rocha-Peña, M.A. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia* 35:441-450.
  15. Sandoval-Alejos, B.D., Iracheta-Cárdenas, M. M., Rocha-Peña, M. A., Manjunath, K. L. Lee, R. 2005. Evaluación de antisueros desarrollados para la proteína recombinante de la cápside del virus tristeza de los cítricos. XXXII Congreso Nacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih. Septiembre 26-29, 2005. México.
  16. Gottwald, T. R., Polek, M., and Riley, K. 2002. History, present incidence, and spatial distribution of Citrus tristeza virus in the California Central Valley. pp 83-94. In: N. Durán-Vila, R.G. Milne, and J.V. da Graça (eds.). *Proceedings 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, California. USA. 450 p.
  17. Polek, M. L. 2000. Permanent monitoring of citrus tristeza virus and suppression of the disease by tree removal: The case of California. *Revista Horticultura Mexicana* 8:19-24.
  18. Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., 1995. Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in *Escherichia coli*: Application of immunodiagnosis. *Phytopathology* 85:691-694.

*Recibido: 7 de septiembre de 2007*

*Aceptado: 17 de septiembre de 2007*